



**J. W. Suh Patent Law Office**  
徐種完 國際特許法律事務所

7th Fl., New-Seoul Building  
828-8, Yeoksam-Dong, Kangnam-Ku,  
Seoul, 135-080, Korea  
TEL : 82-2-539-1970  
FAX : 82-2-552-5108  
82-2-563-5108

서울특별시 강남구 역삼동  
828-8호 뉴서울빌딩 701호  
TEL : (02) 539-1970  
FAX : (02) 552-5108  
(02) 563-5108

JWS : 2001-3-270

2001년 3월 15일

수 신 : 경희대학교 치과대학  
참 조 : 김 성 진 교수님  
명 칭 : 세신추출물을 함유하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물  
제 목 : 특허출원 제2001-12840호의 출원 완료 통보  
당소파일번호 : 2001-DP-103

1. 귀사의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 귀사의 의뢰에 따라 다음과 같이 특허출원을 하였음을 알려드립니다.  
- 다 음 -

출원인	출원번호	출원일자	발명의명칭	우선권 주장	심사 청구
김성진	제2001-12840호	2001.03.13.	세신추출물을 함유하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물	없음	없음

3. 본 건에 대한 심사청구는 2006년 3월 13일까지 완료되어야 하므로 별도로 지시하여 주시기 바라며, 특허청의 심사는 심사 청구된 순서대로 진행되며 만약 기간 내에 심사청구를 하지 않을 경우 취하 간주됨을 양지하시기 바랍니다.
4. 본 건의 출원공개는 최초 출원일로부터 1년 6개월경과 후(2002년 9월 13일)이며, 특허공개공보에 그 출원내용이 공개됩니다.
5. 본 건의 자진보정 기간은 최초 출원일로부터 1년 3개월(2002년 6월 13일)까지이므로, 보정할 사항이 있으면 기간 내에 연락 주시기 바랍니다.
6. 본 건의 국내우선권 주장출원을 위한 우선 기간은 출원일로부터 1년(2002년 3월 13일)까지입니다. 참고로 말씀드리면, 국내우선권 주장출원은 원출원을 계속 연구한 결과 실시예 추가 등 원 출원의 범위를 벗어나는 보정을 하고자 하는 경우에 출원할 수 있습니다. 따라서 본 출원을 개량한 발명을 출원하고자 하시면 기간 내에 연락 주시기 바랍니다.

본 특허출원에 대한 특허청의 조치가 있는 대로 그 진행상황을 계속 알려드리겠습니다.

서종완 국제특허법률사무소  
변 리 사 서 종 완



- ※ 첨부서류 :
- |            |    |
|------------|----|
| 1. 출원서 사본  | 1부 |
| 2. 출원번호통지서 | 1부 |
| 3. 청구서     | 1부 |

**BEST AVAILABLE COPY**



919980002838



10111010000000000000

방식 심사 사관	담 당	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0002

【제출일자】 2001.03.13

【발명의 국문명칭】 세신추출물을 함유하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용  
조성물

【발명의 영문명칭】 Composition containing asiasari radix extracts for  
protecting brain cells and improving memory

【출원인】

【성명】 김성진

【출원인코드】 4-1998-044990-1

【대리인】

【성명】 서종완

【대리인코드】 9-1998-000283-8

【포괄위임등록번호】 1999-058149-1

【발명자】

【성명】 김성진

【출원인코드】 4-1998-044990-1

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

서종완 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 8 면 8,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】			37,000	원
【감면사유】	개인(70%감면)			
【감면후 수수료】			11,100	원
【첨부서류】	1.요약서· 명세서(도면)_1통			

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물에 관한 것으로, 각종 스트레스, 음주, 흡연 등 환경적 요인으로 인하여 뇌손상을 받고 있는 현대인들의 뇌세포 보호효과를 유발하여 퇴행성 질환의 예방 및 치료와 기억력 증진 효과를 유발하는 약제 및 건강보조식품등으로 이용할 수 있다.

### 【대표도】

도 1

### 【색인어】

세신, 신경보호, 기억증진

도 9는 경구투여시 세신추출물(분획 2)의 기억력 증진효과(8방향 방사 미로 시험)를 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물에 관한 것이다.

뇌세포의 손상에 관여 하는 중요한 인자중의 하나는 아미노산인 글루타메이트이다. 글루타메이트는 주로 4가지의 수용체 즉, NMDA수용체, AMPA수용체, 카이네이트(Kainate) 수용체 및 1S,3R-ACPD 수용체에 결합하여 작용을 나타낸다[Craig CR, Stitzel RE, Modern Phramacology with clinical applications, 293-302, 1997].

뇌허혈과 같은 자극이 있을 경우, 뇌세포에 산소공급이 줄어들게 되고 결과

형기성 해당작용이 증가하고 조직내의 에너지원인 ATP가 줄어들어 이온펌프의 작용  
원기성 해당작용이 증가하고 조직내의 에너지원인 ATP가 줄어들어 이온펌프의 작용

저혈혈과 같은 자극이 있을 경우, 뇌세포에 산소공급이 줄어들게 되고 결과  
1997].

CR, Stitzel RE, Modern Phramacology with clinical applications, 293-302, 1997.  
이트(Kainate) 수용체 및 1S,3R-ACPD 수용체에 결합하여 작용을 나타낸다[Craig  
트이다. 글루타메이트는 주로 4가지의 수용체 즉, NMDA수용체, AMPA수용체, 카이네

뇌세포의 손상에 관여 하는 중요한 인자중의 하나는 아미노산인 글루타메이트  
이다.

본 발명은 세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물에

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

oxide) 억제제, 유리라디칼 제거제(free radical scavenger), 나트륨채널 억제제, 글루타메이트 유리억제제, 성장인자, 산성화(acidosis), 저체온법(hypothermia), 칼륨채널 활성화제(potassium channel activators)등의 개발이 시도되고 있다.

NMDA 길항제로는 도조사일핀(dozocylpin) (MK 801), 셀포텔(selfotel), 세레스테이트(cerestat), 덱스트로메톨판(dextrometorfan) 등이 있으나, 이 약물들은 저용량으로 투여시, 지각인지의 변화, 불쾌감, 안구진탕증(nystagmus), 저혈압 등을 유발하며, 고용량으로 투여시 흥분, 집착(paranoia), 환각과 같은 정신적인 부작용을 나타낸다. AMPA 길항제의 경우 NBQX가 개발되었으나 심각한 신장독성의 발현으로 의약품으로서의 실용가능성이 아주 낮은 실정이다. 따라서 독성이 없는 뇌보호제의 개발이 시급한 실정이다.

흥분성 신경 전달물질에 의한 흥분성 독성(excitotoxicity)은 세포 스트레스를 유발하여 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중 및 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 등의 퇴행성 신경질환(neurodegenerative disorders)과 같은 병리학적 상태를 유발하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 [Halloween, B., Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem. 59, 1609-1623, 1992; Coyle, J. T. 및 Puttfarcken, P., Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science 262, 689-695, 1993; Olanow, C. W., A radical hypothesis for neurodegeneration. trends Neurosci. 16, 439-444, 1993]. 최근의 연구에 의하면 AMPA 수용체는 알츠하이머병의 발생에 아주 중요한 역할을 할 수 있다고 제시되어 있다. AMPA 수용체의 활성화

에 의한 신경세포 손상은 특히 알츠하이머병과 관련된 전뇌 기저 콜린성 뉴런(basal forebrain cholinergic neurons: BFCNs)에 선택적으로 발생함으로서, AMPA 길항제를 이용하여 알츠하이머병 치료제 개발을 시도할 수 있음을 제시하고 있다[Weiss, J. H. et al., Basal forebrain cholinergic neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated neurotoxicity. Neuroscience 60, 659-664].

아교세포는 신경세포의 생존에 결정적인 역할을 하고 있다. 발달과정의 중추 신경계에서는 신경세포의 정확한 이동과 증식을 지배하며 발달후에는 신경세포의 항상성과 시냅스 유연성(synaptic plasticity)을 유지하는데 관여하고 있다. 또한 아교세포는 신경세포의 생존과 사멸에 필수적인 신경세포의 메시지를 개세할 수 있는 수용체와 신경 전달물질들을 함유하고 있다. 따라서 아교세포를 외부의 손상으로부터 보호하는 것은 결국 신경세포의 유연성, 항상성 및 생존과 연관된다 하겠다.

중추신경계의 퇴행성 신경질환(neurodegenerative disorders)은 때로 기억과 인지기능의 저하를 수반한다. 특히, 치매는 현대와 같은 고령화 사회의 중대한 문제로서 그 원인으로 유전, 노화, 뇌손상, 흡연 및 음주와 같은 환경적 요인 및 기타 복합인자들을 들 수 있다. 주로 해마(hippocampus)가 많이 손상되어 있고 이는 일반적으로 뇌의 아세틸콜린 함량의 감소와 밀접한 관련성이 있다. 현재 아세틸콜린 에스테라제 억제제(acetylcholine esterase inhibitor)들이 뇌의 아세틸콜린 양을 증가시켜 알츠하이머성 치매의 치료에 널리 사용되고 있는 실정이다.

### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명의 발명자들은 각종 스트레스, 음주, 흡연 등 환경적 요인으로 인하여 뇌손상을 받고 있는 현대인들의 뇌세포 보호효과 및 기억력 증진효과를 유발하는 물질에 대한 오랜 연구 결과, 세신 추출물이 뇌세포 보호작용과 더불어 기억력 증진에 우수한 효과를 나타내는 것을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

### 【발명의 구성】

본 발명은 세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 조성물 총중량에 대하여 세신추출물을 0.5 ~ 50 중량%로 포함하는 것을 특징으로 한다.

세신(*Asiasari Radix*)은 족두리 풀(*Asiasarum sieboldi* F. MAEKAWA), 민쪽도리풀(*Asiasarum heterotropoides* F. MAEKAWA var., *Asiasarum seoulensis* F. MAEKAWA)이라고도 한다. 다년생 초본으로 옆으로 뻗어나가는 근경은 비교적 짧고, 마디가 많고 지름이 1mm 내외의 잔뿌리를 달고 있다. 고르지 않게 구부러진 노끈 모양으로서 지름 3~ 5mm인 황갈색의 마디진 근경에 길이 5~ 20cm 내외의 뿌리가 많이 달려 있는데 색깔은 담갈색이고 맛맛하고 아주 얇은 세로 주름이 있다.

그 추출물은 메틸유게놀(methyleugenol), 아사릴케톤(asaryketone), 시네올(cineol), 사프롤(safrole), 리모넨(limonene), 유카반(eucarvone) 등의 정



유, N-이소부틸 2,4,8,10-도데카테트라엔아미드, 펠리토린(pellitorin) 등의 산아미드(acid amide), (-) 아사리닌(asarinin) 등의 리그난, 히겐아민(higenamine: 강심성분) 등의 알칼로이드 등을 함유하며 체온 강하, 진경, 항 히스타민작용, 강심작용을 나타내며 국소마취, 진통, 해열, 진해, 거담 및 이뇨 목적으로 응용되고 있다. 하지만 지금까지 세신추출물이 뇌세포 보호 및 기억력 증진 효과가 있다는 보고는 없었다.

본 발명의 세신추출물은 세신을 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 및 아세톤, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에테르, 에틸아세테이트 등의 유기용매를 가하고 5 내지 80도, 바람직하게는 30 내지 55도에서 15분 내지 48시간, 바람직하게는 30분 내지 12시간 동안 추출하여 얻는다. 또한, 얻어진 추출물을 감압건조시켜 분말형태로 만들 수도 있다.

본 발명의 세신추출물은 세신을 메탄올을 추출용매로 하여 추출하고, 이 추출물을 메탄올:물 혼합용매에 녹인 후 산으로 pH 2~ 4로 조절하고 동량의 클로로포름으로 추출하여 얻은 분획물일 수 있다. 이때 메탄올: 물 혼합용매의 혼합비는 1:0.2~ 1.5의 범위로 하는 것이 바람직하다.

또한 본 발명의 세신추출물은 메탄올을 추출용매로 한 세신추출물 중 클로로포름에 용해되지 않는 분획부를 수산화암모늄으로 pH 9~ 12로 조절한 후 동량의 클로로포름:메탄올 혼합용매로 추출하여 얻은 분획물일 수 있다. 이때 클로로포름:메

탄을 혼합용매의 혼합비는 1:0.1~ 1의 범위로 하는 것이 바람직하다.

또한 메탄올을 추출용매로 한 세신추출물 중 클로로포름 및 클로로포름:메탄올을 혼합용매에 용해되지 않는 분획부를 메탄올로 추출하여 얻은 분획물일 수도 있다.

본 발명의 세신 추출물을 포함하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

적절한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘, 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

본 발명에 따른 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제 및 좌제 등의 제제형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 또한 멸균 주사용액의 형태일 수 있다.

본 발명에서 사용되는 세신추출물은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일일 0.1 내지 500mg/Kg의량을 일일 1 내지 수회 투여할 수 있다. 세신 추출물 및 분획물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를

한정하는것은 아니다.

본 발명의 세신추출물을 포함하는 조성물은 상기와 같은 제형으로 뇌세포 보호 및 기억력 증진을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 세신 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이다.

본 발명은 다음의 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명에 이들  
에 의해 제한 되지는 않는다.

#### 실시예 : 세신 추출물 제조

세신 250g을 세절하여 속실팳 장치를 이용하여 80% 메탄올 (750 ml)로 3회 추출한다. 추출물을 여과한 후 회전진공농축기(rotary evaporator)를 이용하여 감압 농축하고, 동결건조한다(분획 1). 동결건조한 메탄올 추출물 10g을 다른 유기용매로 분획하기 위하여 200 ml의 메탄올: 물 (4:1)에 녹인 후 2M 황산으로 pH 3으로 조절하여 동량의 클로로포름으로 3회 추출한다. 클로로포름 층은 감압농축 및 동결건조하고(분획 2), 물층은 수산화암모늄( $\text{NH}_4\text{OH}$ )으로 pH 10으로 조절한 후 동량의 클로로포름: 메탄올 (3:1)로 2회 추출한다. 클로로포름:메탄올 (3:1)에 녹는 층은 감압농축 및 동결건조한다 (분획 3). 물층은 감압농축한 후 메탄올로 추출하여

메탄올층 (분획 4)과 물층 (분획 5)을 감압농축 및 동결건조하여 시료로 사용한다.

#### 실험예 1. 그리스 갭 분석시험(Grease Gap assay)

백서 대뇌피질의 "웨지(Wedges)"를 제조하여 두 구획의 브레인 배스(two compartment brain bath)에 장치한 후 시험을 시행하였다 [Harrison NL, Simmonds, MA, Quantitative studies on some antagonists of N-methyl D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. Br. J. Pharmacol. 84, 381-391].

뇌를 신속히 꺼내어 뇌조직 절편기를 이용하여 앞쪽 2~3 mm를 제거하고 나머지 부위를 수직으로 잘라서 500-600  $\mu$ m 두께의 관상 절편(coronal section)을 제조하여 신속히 산화된 크랩스 배지(oxygenated Krebs medium)에 넣은 후 정중선을 중심으로 2등분하고 대뇌피질과 뇌량(corpus collasum)을 포함하는 대뇌피질쪽이 1.5 mm이고 뇌량쪽은 1 mm인 웨지를 제조하였다. 상온에서 산화된 크랩스배지에 2시간 방치 후 웨지들을 두 구획의 브레인 배스(two compartment brain chamber)에 고압 실리콘 그리스(high vacuum silicone grease)를 바른 슬릿사이로 장치한다. 양쪽 구획 모두 1분당 2ml의 속도로 크랩스배지를 관류시킨다. 세신 추출물 (AR : 분획 1)은 대뇌피질쪽의 구획에 10  $\mu$ g/ml의 농도로 30분전에 미리 투여하기 시작하고, 흥분성 아미노산인 AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) (40 $\mu$ M)를 20분간 투여하여 두 구획사이의 d.c. 전위를 Ag/AgCl 전극을 통하여 측정하고 이를 증폭기(amplifier)를 통하여 증폭한 후 맥랩 데이터 포착시스템(McLab Data Acquisition System)을 이용하여 측정하였다.

AMPA에 의한 신경세포의 탈분극 (depolarization)유발은 신경세포의 손상에 의한 자극의 척도로 간주되어지고 있다. 실험결과 AMPA 40  $\mu$ M을 두 구획의 브레인 배스(two compartment brain bath)에 투여하면 도 1A에서 나타난 바와 같이 0.6 mV의 탈분극이 유도되는 반면, 세신 추출물(AR) (10  $\mu$ g/ml)을 전처리하고 AMPA를 투여하면 탈분극 정도가 현저히 줄어들고 있음을 나타내고 있다 (도 1B). 세신에 의한 억제효과는 대조군에 비하여 약 40% 정도였다. 따라서 세신 추출물은 AMPA에 의한 신경손상을 보호하는 효과가 현저함을 입증하고 있다.

#### 실험예 2. 세포 생존율 시험 (MTT assay)

MTT 실험은 미토콘드리아 탈수소효소(dehydrogenase)의 활성을 비색정량하여 측정하는 방법으로 미토콘드리아 산화환원전위(mitochondrial redox potential)나 세포 생존율을 알아보기 위해 주로 쓰인다(Mosmann et al. 1983).

본 실험에서는 세포의 생존율을 알아보기 위해 각각 다른 농도의 세신 추출물이 첨가된 배양액으로 배양된 세포에 MTT 시약(Sigma, USA) ; 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 PBS(phosphate -buffered saline)에 5 mg/ml로 녹여 여과한 후 최종 1 mg/ml의 농도로(96 웰 : 100  $\mu$ l 배양액 + 25  $\mu$ l, 5 mg/ml MTT) 각 웰에 첨가하고 37  $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하였다. 이때 활동하는 미토콘드리아를 가진 살아있는 세포는 테트라졸리움 고리(tetrazolium ring)를 분해하여 짙은 남색의 포르마잔(formazan)을 생성하므로, 이를 녹여내기 위해

추출완충제(extraction buffer: 50% N,N-디메틸포르마이드(N,N-dimethyl formamide)에 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 20 %w/v가 되도록 37 °C에서 녹인 후 pH 4.7로 맞추었다.) 100  $\mu$ l를 첨가하고 37°C에서 20시간동안 배양한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때에 대조군(blank)으로는 추출완충제(extraction buffer)를 사용하였고, 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광정도를 %세포 생존율로 나타내었다.

실험결과 도 2에서와 같이 NGF 처리로 신경세포로 분화를 유도시킨 PC12 세포에서 AMPA (40  $\mu$ M)을 투여하면 거의 50%정도의 세포가 죽게되는 반면 세신추출물 (AR : 분획 1) (10  $\mu$ g/ml)을 전처리 할 경우 세포의 생존율을 90 %이상으로 회복시키고 있다. 도 3에서와 같이 실시예 1을 분획한 분획 2, 분획 3, 분획 4, 분획 5를 시험한 결과 분획 4가 현저하게 AMPA에 의한 신경세포 손상을 억제함을 발견하였다.

반면, 도 4에서와 같이 교세포인 C6 아교세포(C6 glial cell)의 경우 AMPA (40  $\mu$ M)을 처리하면 약 35%의 세포가 죽게되는 반면 세신 추출물(AR : 분획 1)을 전처리할 경우 세포의 생존율이 약 10% 회복되고 있다.  $ZnCl_2$ 는 세포내에서 유리 라디칼을 생성시켜 세포손상을 가하는 물질로서, 도 5에서와 같이  $ZnCl_2$  (100  $\mu$ M)을 처리하여 C6 아교세포에 산화적인 손상을 주는 경우, 분획 1, 분획 2, 분획 3, 분획 4, 분획 5를 시험한 결과 분획 1은  $ZnCl_2$ 에 의한 산화적 손상을 100% 회복시켜 대조군의 상태와 유사하게 세포의 생존율을 유지시켜 주었으며, 분획 4는  $ZnCl_2$ 에

의한 산화적 손상을 58% 회복시켜 주고 있음을 발견하였다.

### 실험예 3. 기억 시험 ( $\text{NaNO}_2$ assay)

1)  $\text{NaNO}_2$ 에 의한 뇌의 산소대사 결핍과 기억 및 학습과 관련있는 콜린성 신경전도는 서로 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다 [Schindler등, Nootropic drugs: Animal models for studying effects on cognition. Drug Develop Res 4: 567-576, 1984].

웅성생쥐 (20 g)에 세신 추출물 (분획 1)을 100 mg/kg, i.p.로 투여하고 60 분 후에,  $\text{NaNO}_2$ 를 250 mg/kg, s.c.로 주사하고 호흡이 정지할 때까지의 시간을 측정하여 호흡이 지속되는 시간을 대조군에 비교하여 기억향상효과를 평가한다.

$\text{NaNO}_2$ 에 의한 뇌의 산화적 대사(oxidative metabolism)장애와 콜린성신경억제로 인한 기억장애는 서로 밀접한 관련이 있다. 따라서, 약물 처리후  $\text{NaNO}_2$ 에 의한 사망유발 시간의 지연이 나타난다면 그것은 그 약물의 기억력 증가효과를 나타내는 척도의 하나로 간주될 수 있다.

실험결과 도 6에서 보여지듯이  $\text{NaNO}_2$ 에 의한 뇌대사 장애로 인한 사망유도 시간에 비하여 세신 추출물(100 mg/kg, i.p.)을 전처리한 경우 25%의 증가를 유발하므로써 세신에 의한 기억력 증가효과가 있음을 알수 있다.

최초의 메탄올 추출물 AR (분획1)을 다른 유기용매를 이용하여 더 분획하여 제조한 분획 2, 분획 3, 분획 4, 분획 5를 100 mg/kg, i.p.로 마우스에 투여하고, 상기한 방법의  $\text{NaNO}_2$  기억시험을 시행한 결과 분획 4는 최초의 메탄올 추출물인 분획1과 유사한 기억증진효과를 보였으며 분획 2는 가장 강력한 기억력 증진효과 (50% 증가)를 나타내었다(도 7). 또한 상기한 분획이 경구투여로 효과가 있는지를 실험한 결과 분획2를 10 mg/kg용량으로 경구로 투여하고 2시간 후  $\text{NaNO}_2$  를 투여하고 호흡이 멈추어 질 때 까지의 시간을 측정한 결과 대조군에 비하여 50%의 기억력 증가효과를 유발하였다(도 8).

2)  $\text{NaNO}_2$  기억시험에서 현저한 기억력 증진 효과를 보인 분획 2를 이용하여, 직접적인 기억력 증진 효과유무를 밝히기 위하여 8방향 방사 미로 (8 arm radial maze) 기억시험을 시행하였다 [Ikonen S, Riekkinen Jr. P, Effects of apamin on memory processing of hippocampal-lesioned mice. European Journal of Pharmacology 382: 151-156, 1999).

중앙부위는 직경 20cm이며 길이 25cm, 높이 15cm, 폭 6cm의 arm 8개로 구성된 미로를 사용하였다. 시험을 시작하기전 3일간 매일 5분씩 마우스를 연습시켰다. 시험기간중에는 8개의 arm중 4개에만 먹이를 두었으며, 각 마우스마다 무작위로 4개씩 지정하였다. 시험은 4개의 먹이 모두가 먹히거나 15분까지만 측정하였다. 실행 기억 오류 (working memory error)는 전에 들렀던 arm을 다시 가는 경우를 정의



하며, 참조기억오류 (reference memory error)는 먹이를 두지 않은 arm을 처음으로 가는 경우로 정의하였다. 분획 2를 매일 1회씩 10 mg/kg을 경구투여 하며 3일간 투여 한후 기억시험을 실시하였다.

도 9에서 보는 바와 같이 실행기억오류는 대조군에 비하여 69%감소하였으며, 참조기억오류는 58% 감소하였다. 그리고 먹이 4개를 모두 찾은 성공율은 대조군의 경우 85%였으나 분획2를 투여한 경우 93%로 현저히 증가하였다.

#### 실험예 4. 세신추출물의 경구독성시험

20 g 정도의 ICR 마우스 25마리를 온도 23 ℃, 상대습도 50%, 조도 150~ 300 룩스(Lux)의 동물실에서 1주일간 사육한 후 각 5마리씩 5군으로 나누어 실험하였다.

실시에에서 얻은 세신 추출물(분획 1)을 0.1 % 트윈(Tween) 80에 녹인 후, 5 그룹의 마우스에 각각 100, 1000, 3000, 5000 및 10000 mg/kg의 용량으로 1회 경구 투여하였다. 투여 후 7일간 일반 증상의 변화 및 사망 동물의 유무를 관찰 하였다. 그리고 투여 7일째 마우스를 치사시켜 해부하고 육안으로 내부 장기를 검사하였다.

세신 추출물 투여로 인한 이상 소견은 관찰되지 않았으며 세신 추출물(분획 1)의 LD<sub>50</sub> 값은 3,400 mg/kg으로 나타났다.

#### 제형예 1

### 1. 정제

세신 메탄올 추출물 500.0 mg

유당 500.0 mg

탈크 5.0 mg

마그네슘 스테아레이트 1.0 mg

상기의 성분을 통상의 정제의 제조방법으로 제제화한다

### 2. 정제

세신 메탄올 추출물의 클로로포름 분획 50.0 mg

유당 50.0 mg

탈크 0.5 mg

마그네슘 스테아레이트 0.1 mg

### 3. 정제

세신 메탄올 추출물의 메탄올 분획 50.0 mg

유당 50.0 mg

탈크 0.5 mg

마그네슘 스테아레이트 0.1 mg

### 【발명의 효과】

세신 추출물을 포함하는 조성물은 세신추출물의 뇌세포 보호기능은 뇌세포손상으로 발생하는 퇴행성 뇌질환(치매, 뇌졸중, 근위축성 축성 경화증 등)의 예방과 치료 효과 뿐 아니라 기억력 향상을 유발하는 효과로 인하여 각종 환경적 스트레스로 인한 뇌손상의 위험을 안고있는 현대인의 뇌세포 보호 기능과 치매환자를 포함하는 기억력이 저하된 사람에게 유용하게 사용될수 있다.

**【특허청구범위】**

**【청구항 1】**

세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물.

**【청구항 2】**

제 1항에 있어서, 세신추출물이 전체 조성물에 대하여 0.5~ 50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 3】**

제 1항에 있어서, 세신추출물이 세신을 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 및 아세톤, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에테르, 에틸아세테이트 등의 유기용매의 추출용매로 추출하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 4】**

제 1항에 있어서, 세신추출물이 세신을 메탄올을 추출용매로 하여 추출하고, 이 추출물을 메탄올:물 혼합용매에 녹인 후 산으로 pH 2~ 4로 조절한 후 동량의 클로로포름으로 추출하여 얻은 분획물인 조성물.

**【청구항 5】**

제 1항에 있어서, 세신추출물이 세신을 메탄올을 추출용매로 하여 추출하고, 이 추출물 중 클로로포름에 용해되지 않는 분획부를 수산화암모늄으로 pH 9~ 12로 조절한 후 동량의 클로로포름:메탄올 혼합용매로 추출하여 얻은 분획물인 조성물.

**【청구항 6】**

제 1항에 있어서, 세신추출물이 세신을 메탄올을 추출용매로 하여 추출하고,

이 추출물 중 클로로포름 및 클로로포름:메탄올 혼합용매에 용해되지 않는 분획부를 메탄올로 추출하여 얻은 분획물인 조성물.

【청구항 7】

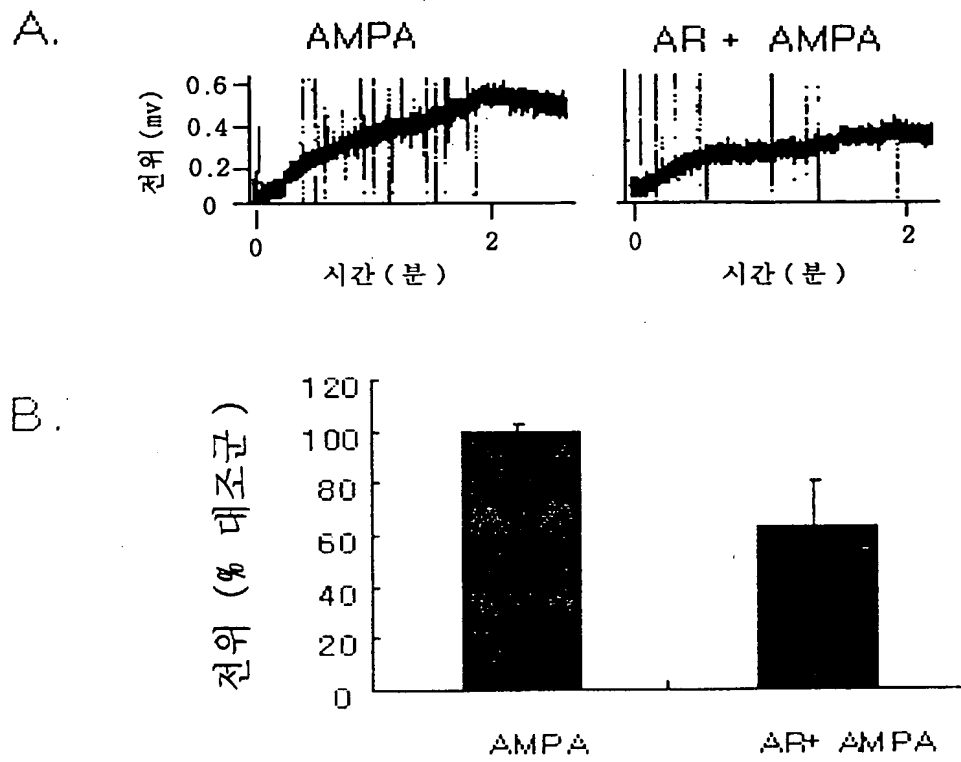
제 1항에 있어서, 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

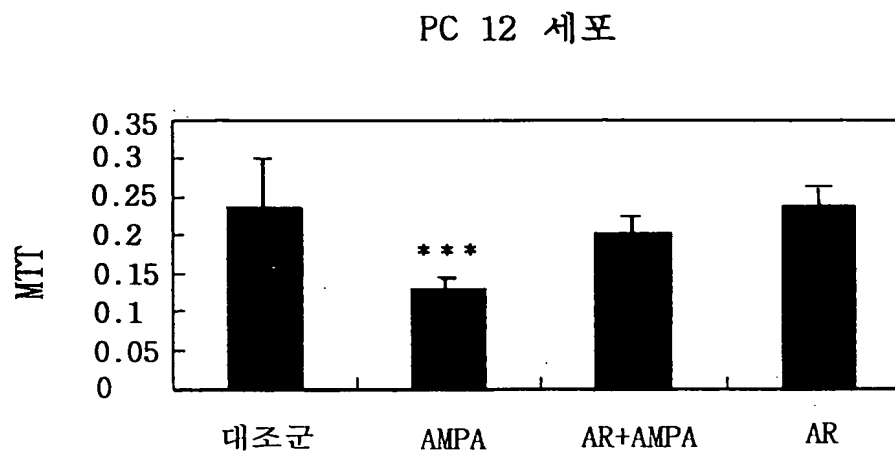
제 1항에 있어서, 산제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【도면】

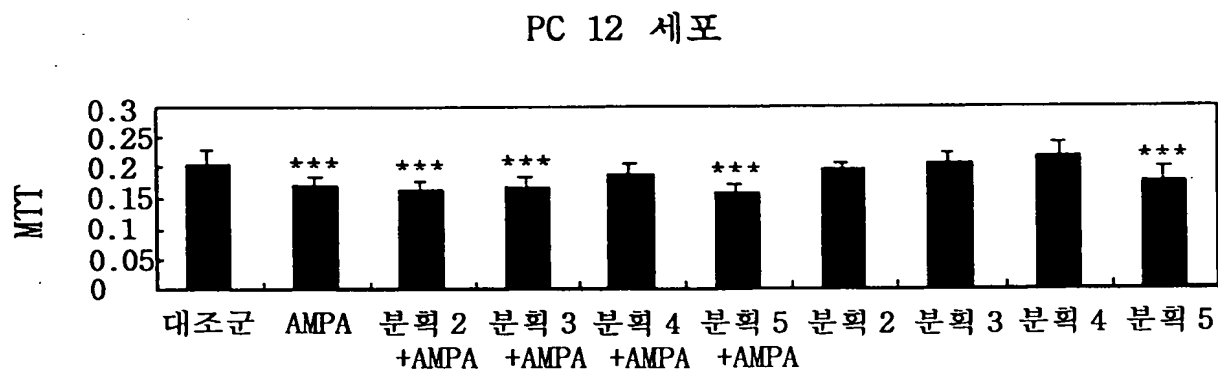
【도 1】



【도 2】



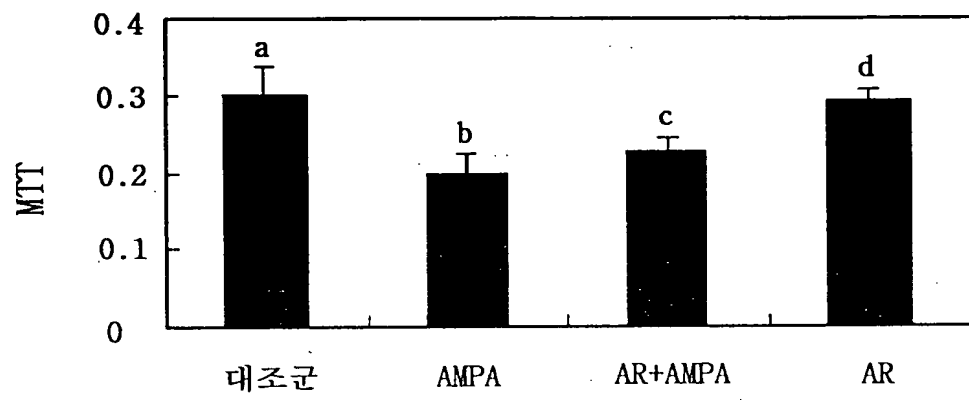
【도 3】



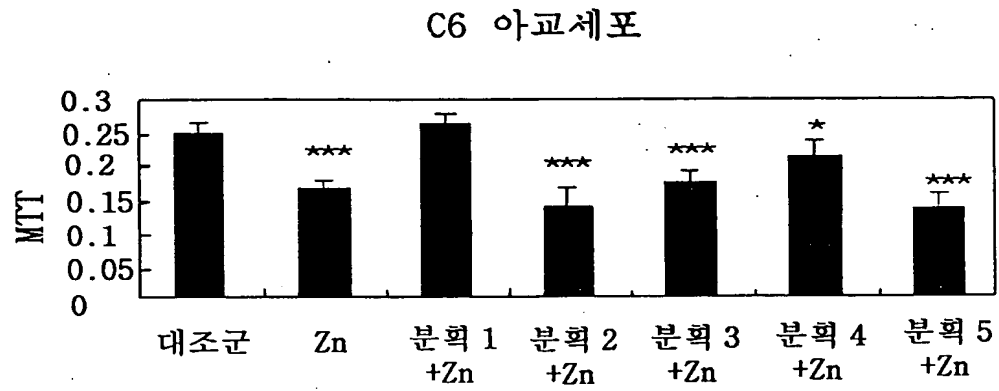


【도 4】

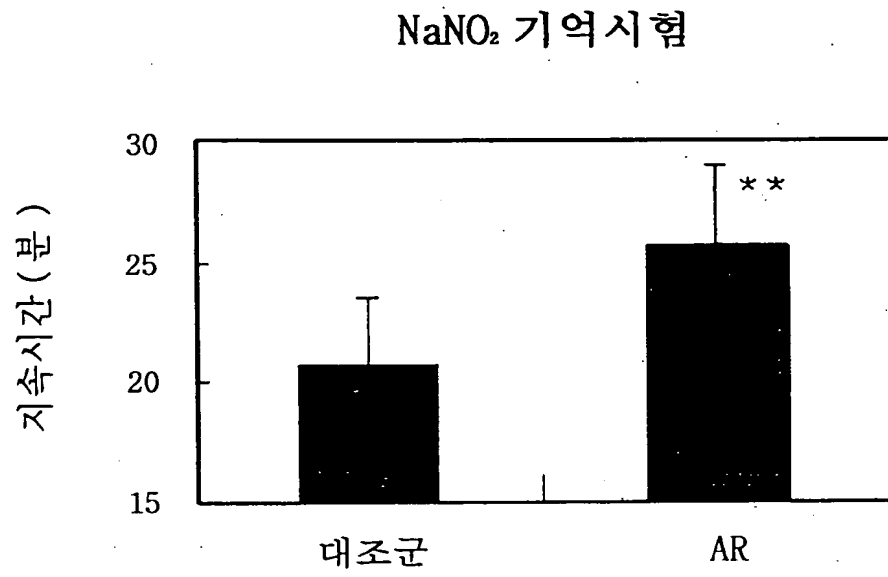
C6 아교세포



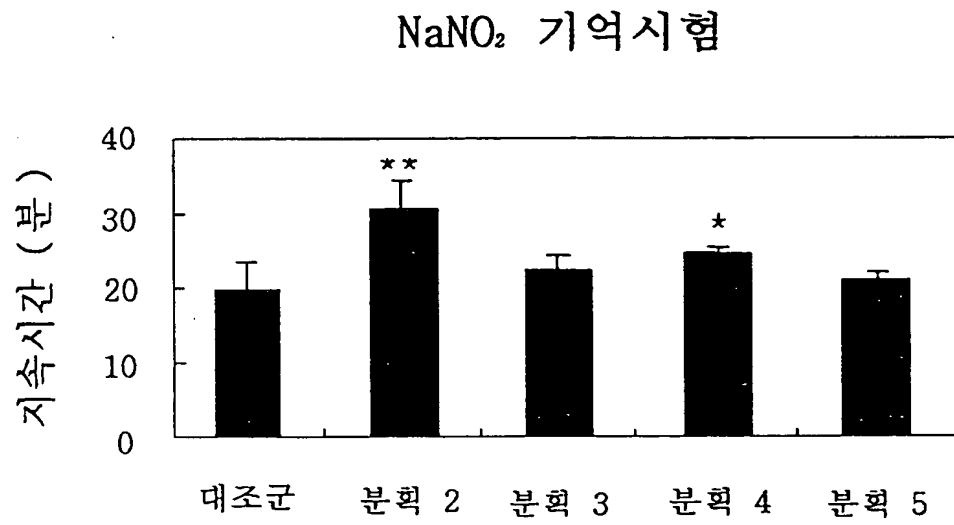
【도 5】



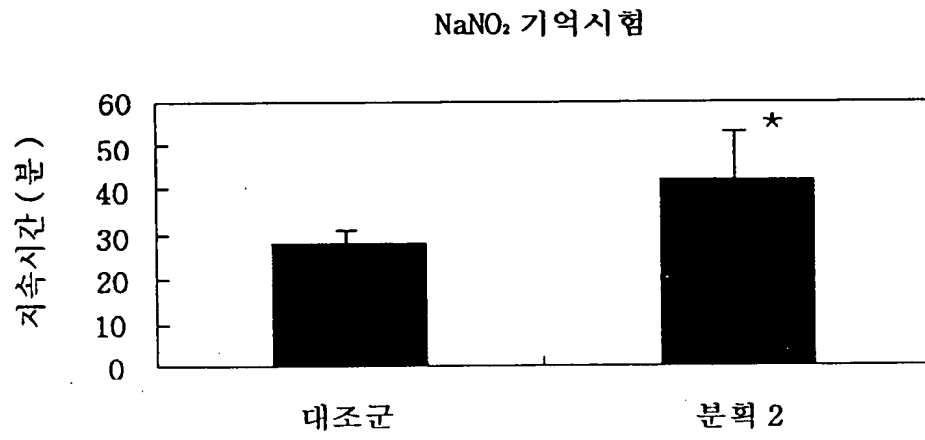
【도 6】



【도 7】

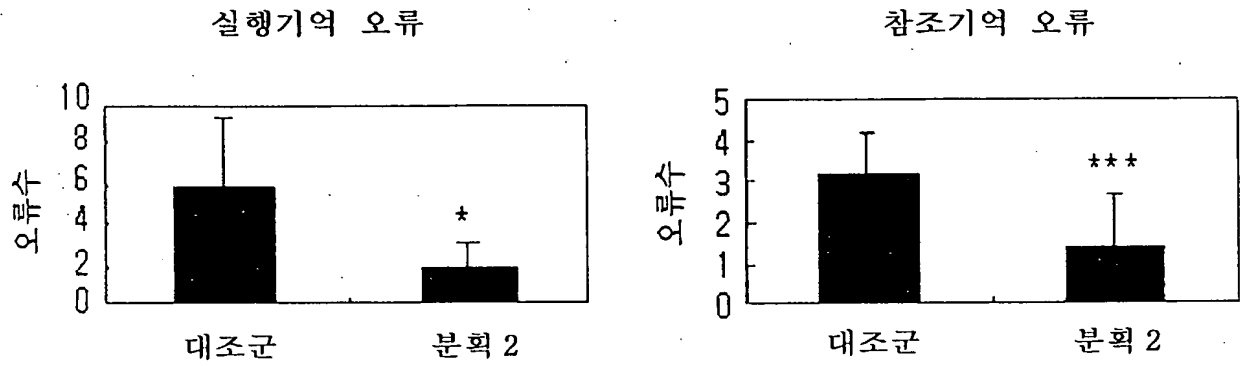


【도 8】



【도 9】

8방향 방사 미로 기억 시험



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**